



TITLE:

尿中より分離された各種細菌による実験的膀胱結石

AUTHOR(S):

新井, 豊; 竹内, 秀雄; 友吉, 唯夫

CITATION:

新井, 豊 ...[et al]. 尿中より分離された各種細菌による実験的膀胱結石. 泌尿器科紀要 1997, 43(3): 207-211

ISSUE DATE:

1997-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115924>

RIGHT:

尿中より分離された各種細菌による実験的膀胱結石

滋賀医科大学泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)

新井 豊, 竹内 秀雄*, 友吉 唯夫

EXPERIMENTAL BLADDER STONE PRODUCTION BY
HUMAN UROPATHOGENIC BACTERIA

Yutaka ARAI, Hideo TAKEUCHI and Tadao TOMOYOSHI

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

To investigate the formation of infection stones by 5 bacterial species isolated from patients with urinary calculi, such as *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, a zinc disc was implanted and 10^6 bacteria were surgically inoculated at the same time into the bladder of male Wistar rats (10 rats per group). Urinary pH was measured on days 1, 3, 5 and 7. The rats were killed on day 7 and the bladder examined for the formation of infection stones.

Infection stones were formed in all rats inoculated with *P. mirabilis* (mean stone weight 29.7 mg), and in 60% of those inoculated with *S. saprophyticus* (9.7 mg). Small bladder stones were formed in 30% of the rats inoculated with *K. pneumoniae* and 25% of those inoculated with *P. aeruginosa*. No bladder stones were formed in the rats inoculated with *E. coli*. Urinary pH was increased by *P. mirabilis* and *S. saprophyticus* but was unaffected by the other species.

In conclusion, *P. mirabilis* and *S. saprophyticus* play a significant role in the formation of infection stones.

(Acta Urol. Jpn. 43: 207-211, 1997)

Key words: Experimental bladder stone, Infection stone, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, Uropathogenic bacteria

緒 言

感染結石は、尿路結石の15~20%をしめる^{1,2)} 従来より、*Proteus mirabilis* を用いた感染結石に関する基礎的な研究は多く報告されており、この菌が感染結石形成におおいに参与していることはわかっている³⁻⁵⁾ しかし、臨床では、尿路結石を有する患者の尿や結石内にさまざまな細菌が分離培養される⁶⁾ *P. mirabilis* 以外の細菌が尿路結石の形成に関与するかどうかは、いまだ不明である。われわれは、細菌と感染結石形成の関連をあきらかにするために、尿中細菌のウレアーゼ活性が感染結石形成に役割を果たしている^{1,2)} ことに着目し、これまで各種細菌のウレアーゼ活性を *in vitro* で検討し、報告した⁷⁾ 今回、*in vivo* で各種細菌による実験的膀胱結石についてラットを用いて実験し、細菌と感染結石形成の関連をさらに明らかにすることを試みた。

方 法

実験に用いた細菌は、*Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis* および *Staphylococcus saprophyticus* の5種類であり、いずれも尿路結石患者よりえられた臨床分離菌である。各細菌のウレアーゼ活性は、ウレアーゼ活性確認用培地(栄研化学社製)の所見より、*E. coli* と *P. aeruginosa* は陰性であったが *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* および *S. saprophyticus* は陽性であった。これらの細菌を平板寒天培地にて 36°C で24時間培養し、実験に用いた。感染結石形成の方法は、Vermeulen らの方法⁸⁾ を一部変更した。すなわちラットは、体重約 200 g のウィスター系のオスを用いた。ネブタール腹腔内麻酔下に、ラットの下腹部を剃毛し、イソジン消毒後正中切開し、膀胱を露出させた。膀胱頂部に小切開を加え、滅菌した亜鉛リング1個を挿入し、さらに各細菌の 10^7 colony forming units (CFU)/ml の菌液を 0.1 ml 直接膀胱に注入し、膀胱を閉じたのち、腹筋および皮膚を縫合した。術後30分間尿道をクランプし、2時間後より、水分摂取を開始した。各細菌についてラット10匹ずつを用いた。また、対照群としては、10匹のラットに同様に膀胱に亜鉛リングのみを挿入した。餌は日本クレア社の CE-2 を与え、水分は水道水を自由摂取とした。術後1日目、3日目、5日目に強

* 現: 神戸市立中央市民病院泌尿器科

制的に排尿させ尿 pH を pH 試験紙 (東洋ろ紙社製) にて調べた。そして、術後7日目に屠殺し、尿路を観察したのち、膀胱尿を採取し、尿の pH の測定、尿の細菌培養を施行した。膀胱を切開し、亜鉛リングを回収し、結石形成の有無を確認した。創感染や屠殺時の尿培養にて接種菌以外の細菌が分離されたラットは集計より除外した。なお、この実験は、当大学の「動物実験の飼育管理に関する指針」に沿って行われた。また、統計学的有意差は、t 検定にて解析し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

結 果

術後1週間のラットの尿 pH の変化を Fig. 1 に示す *P. mirabilis* を接種したラットでは、術後1日目より著しい尿 pH の上昇がみられ、術後7日目まで持続していた。また、*S. saprophyticus* 接種ラットでは、軽度の尿 pH の上昇がみられた。しかし、他の細菌を接種したラットは対照ラットと同様であり、尿 pH は上昇しなかった。

ラット膀胱に挿入した亜鉛リングおよび膀胱内に形成された結石を Fig. 2 に示す。各細菌別の亜鉛リングに付着した膀胱結石の重量を Fig. 3 に示す。対照群および *E. coli* 接種ラットでは、まったく結石形成がみられなかった。また、*P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* を接種したラットでは、それぞれ25%に平均 3.5 mg, 30%に平均 2.7 mg の結石が形成されたのみであった。*P. mirabilis* 接種群では、すべてのラットの膀胱に平均 29.7 mg (12 mg~50 mg) の結石形成がみられた。また、*S. saprophyticus* を接種した群では、60%に平均 9.7 mg (5~17 mg) の結石がみとめられた。*P. mirabilis* 接種群は、他のすべての群と比較し、統計学的に有意差を認め、また、*S. sap-*

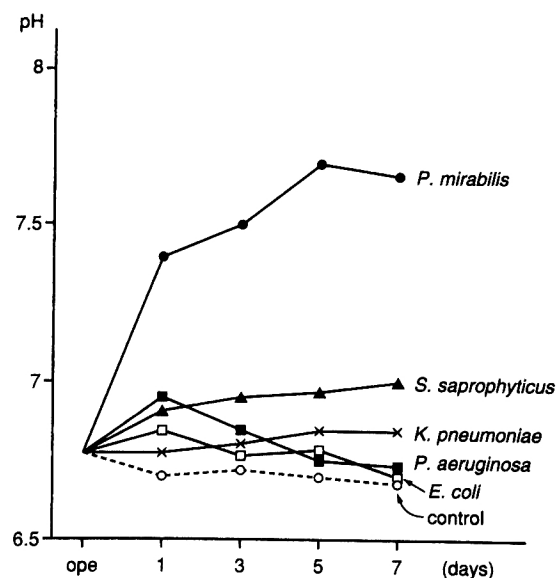


Fig. 1. Urinary pH of rats after operation.

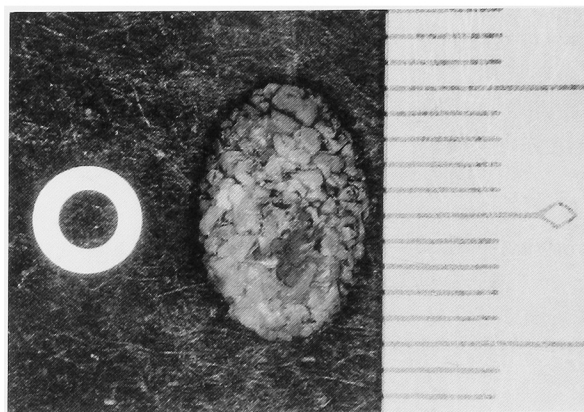


Fig. 2. A zinc disc and a bladder stone.

rophyticus 接種群は、*P. mirabilis* 以外の群と有意差を認めた。

また、屠殺時の尿 pH と膀胱結石形成を Fig. 4 に示したが、全体では、尿 pH が高いラットで結石が形成される傾向があり、結石形成群と結石非形成群間には、統計学的に有意差 ($p < 0.0001$) がみられた。また、各群間を比較すると、*P. mirabilis* 接種群は、尿 pH が高く、他のすべての群と比較し統計学的に有意差を認めた。また、*S. saprophyticus* 接種群も比較的尿 pH が高く、*E. coli* 接種群および対照群と比較し有意差を認めた。

つぎに、屠殺時に採取した膀胱尿の細菌数を Fig. 5 に示す。いずれの菌種でも、細菌数はラットの個体差が著しかった。*P. mirabilis* 接種群ではすべてのラットで尿中細菌数がやや多かった。菌量と結石形成の有無との関係では、かならずしも細菌数が多いほうが結石ができやすい、とはいえず、同群間でも菌量の少ないラットに結石がみられることもあった。

なお、これらの膀胱結石の成分は、赤外線分光分析により、いずれもリン酸マグネシウムアンモニウムであった。

さらに、屠殺時の上部尿路の観察では、水腎症や腎膿瘍がみられ、対照ラットおよび細菌別のそれらの頻度を Table 1 に示す。細菌接種による感染と、挿入した亜鉛リングさらに結石形成により、尿の通過障害が引き起こされ水腎症が発症する。*P. mirabilis* および *S. saprophyticus* 接種ラットで水腎症の頻度が高かった。また、腎膿瘍については、*P. mirabilis* を接種したラットで高頻度にみられ、他の細菌では、尿中細菌数の多いラットに腎膿瘍がみられた。膀胱の組織学的所見では、程度の差はあるが炎症変化のみであり、結石形成の有無によって差は認められなかった。屠殺時の血清クレアチニンは、*E. coli* および *P. aeruginosa* 接種群では、 0.6 ± 0.2 (0.4~1.0) mg/dl, *K. pneumoniae* 接種群では、 0.6 ± 0.2 (0.5~1.3) mg/dl, *S. saprophyticus* 接種群では、 0.7 ± 0.2 (0.5~

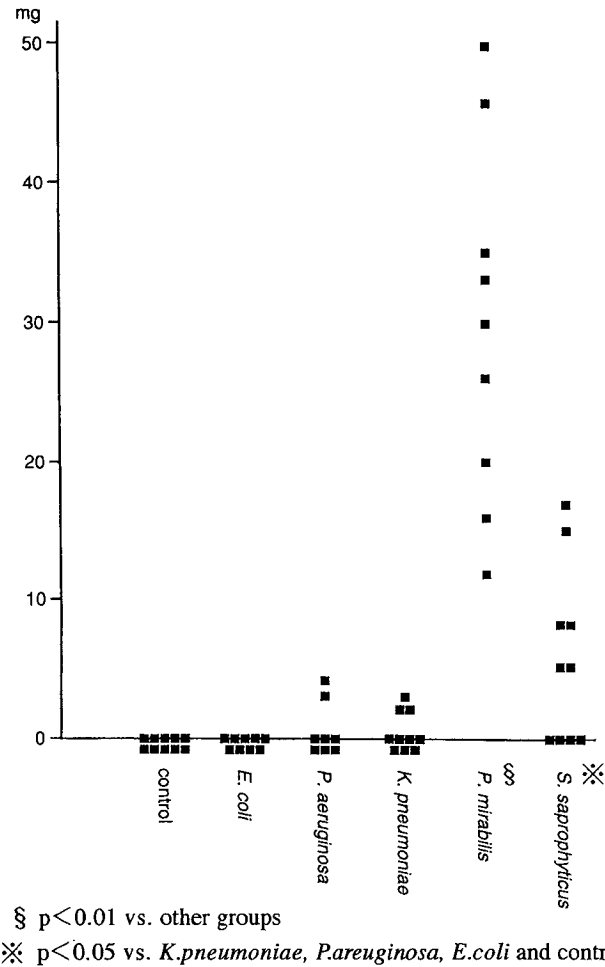


Fig. 3. Weight of bladder stones.

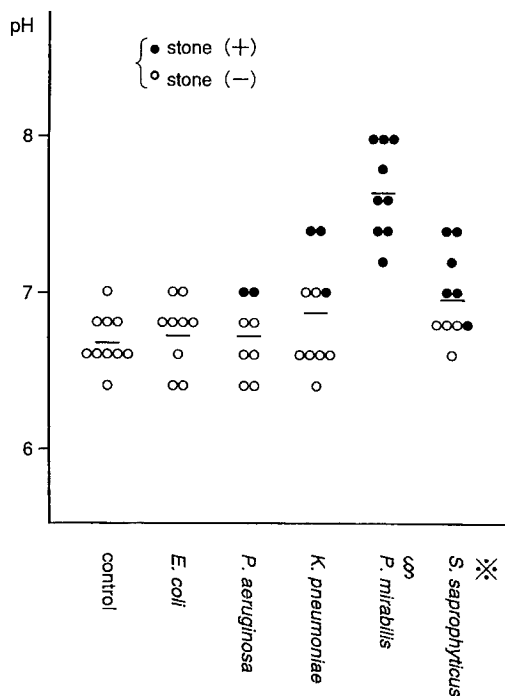


Fig. 4. Urinary pH at day 7.

1.3) mg/dl, そして *P. mirabilis* 接種群では, 0.7 ± 0.2 ($0.5 \sim 1.2$) mg/dl であり, また, 対照群は, 0.5 ± 0.1 ($0.4 \sim 0.7$) mg/dl であった. 水腎症, 膿腎症が著しい数匹のラットに血清クレアチニンの上昇がみられた. 各群間に, 統計学的に有意差はみられなかった.

考 察

リン酸マグネシウムアンモニウム (struvite) やリン酸カルシウム (carbonate apatite) などの感染結石は, 尿中細菌のウレアーゼにより, 尿素が分解されてアンモニアが生じ, 尿のアルカリ化, アンモニウムイオンや炭酸イオンの増加などにより結晶が析出し形成される²⁾ このように, 感染結石は尿素分解細菌の感染が直接の原因とされ, 尿路感染と密接な関連がある. そして, 臨床においては, 感染結石の治療に際し, 結石の再発, 難治性尿路感染症, また, 尿の通過障害や腎障害など多くの問題が関係する. 感染結石は, 尿路結石全体に占める頻度こそ少ないが, 临床上重要な結石の一つである^{9,10)}

従来より, 尿素分解細菌である *P. mirabilis* につい

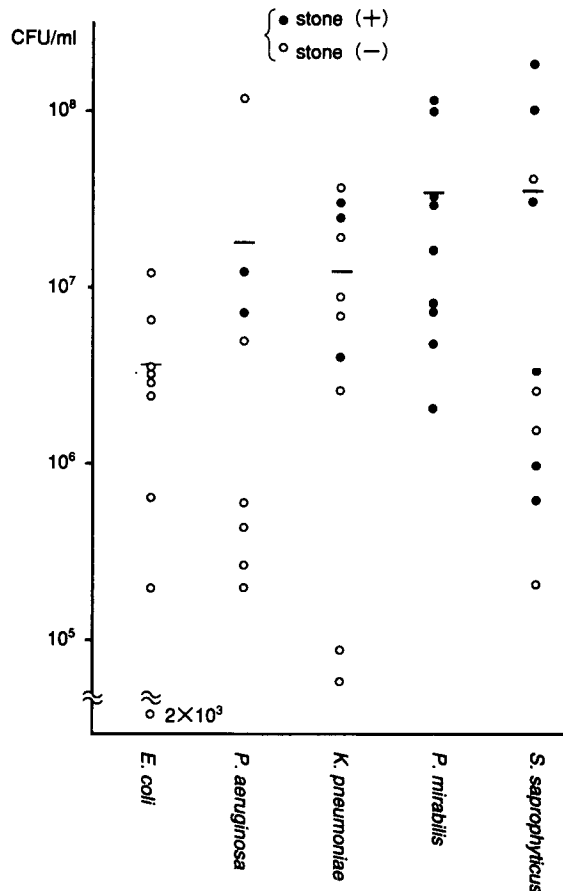


Fig. 5. Bacterial culture of urine in bladder at day 7.

Table 1. Frequency of hydronephrosis and renal abscess in rats

	hydronephrosis	renal abscess
control	1/10	0
<i>E. coli</i>	6/ 9	0
<i>P. aeruginosa</i>	6/ 8	1/ 8
<i>K. pneumoniae</i>	4/10	2/10
<i>P. mirabilis</i>	9/ 9	7/ 9
<i>S. saprophyticus</i>	8/10	2/10

ては、多くの基礎的研究がなされ³⁻⁵⁾、また臨床研究でも、感染を伴う尿路結石の症例から *P. mirabilis* がしばしば分離培養され、この菌による尿路感染が結石形成に重要であるとされてきた^{6,9)}。しかし、一般にはさまざまな細菌が尿より分離され、また、しばしば尿路結石に感染をともなっている¹¹⁾ *P. mirabilis* 以外の細菌については、感染結石との関連は不明であった。この問題を解明するため、われわれは、これまで *in vitro* で、尿中より分離された細菌のウレアーゼ活性や細菌による尿のアルカリ化などを調べた⁷⁾。その結果を参考にして、今回の実験は前述した5菌種を選択し、*in vivo* でおこなった。

細菌接種後1週間のラットの尿 pH の観察で、*P. mirabilis* 接種群では術後1日目より著しい尿 pH 上昇

がみられ、屠殺時まで継続した。これは、菌接種により感染が成立し持続したものと考えられる。また、*S. saprophyticus* 接種ラットにおいても軽度の尿 pH の上昇がみられた。この2菌種に関しては、*in vitro* の尿アルカリ化の結果⁷⁾とよく合致している。

つぎに、膀胱結石形成は、ウレアーゼ活性のない *E. coli* 接種群は対照群と同様まったくみられなかった。また、*P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* 接種群でも、数匹のラットにわずかな結石が見られたのみであった。これは *P. aeruginosa* にはウレアーゼ活性がないためと考えられるし、また、*K. pneumoniae* 接種でも尿 pH 上昇が見られなかったことより、この菌のウレアーゼ活性は弱いと考えられ、このことが結石形成に至らなかった原因であろう。これに対し、*P. mirabilis* 接種群ではすべてのラットに結石形成がみられ、また、*S. saprophyticus* 接種ラットにおいても10匹中6匹と、他の細菌と比較すると高頻度に結石を形成しており、そして統計学的にも有意差を認めており、この2菌種は感染結石の形成におおいに関与すると考えられた。

また、屠殺時の尿 pH と膀胱結石形成の有無を調べたが、尿 pH が7を越えているラットでは、すべてのラットに結石形成がみられた。さらに結石形成群と結石非形成群間で有意差がみられたことや、結石形成が高頻度にみられた *P. mirabilis* および *S. saprophyticus* 接種ラットで尿 pH が高かったことより、やはり尿アルカリ化が結石形成に重要であることが確認された。むしろ尿 pH が7以下でも結石がみられるラットもあり、継続的に個々のラットの経時的な尿 pH の変化が観察されるなら、さらに詳しい尿 pH と結石形成の関連が解明されるであろう。

尿中細菌数を調べたが、10³ CFU/ml から 10⁸ CFU/ml と個体差が著しかった。屠殺時の菌量と、結石形成の有無は関連がみられなかった。手術後から屠殺時まで、同じ程度の尿中細菌が持続することはないであろう。菌数が少ないラットは、菌を接種しても感染に対する抵抗がつよかったのか、または、いったん感染したが自然治癒に向かっている時期にあたったのであろうか。いずれにせよ、菌量が少ないラットには結石はみられなかった。

また、腎の形態的変化を調べると、*P. mirabilis* 接種群では、水腎症、腎膿瘍ともに高頻度に発症し、感染による尿路の障害および感染性の強いことが判明した。むしろ水腎症は亜鉛リングおよびそれに付着した結石による尿路の通過障害も関与するであろう。

尿路の感染結石形成には、細菌接種により、まず感染が成立し、その感染が治癒に向かわずに、ある程度の強さで持続し、そして、ある量以上の細菌数が尿中に存在し、尿アルカリ化が継続することが必要と考え

られる。*P. mirabilis* は、この条件によく当てはまり、強い感染性、増殖性そして尿素分解能を有する細菌である。

今回の実験の結果より、*E. coli*, *P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* は、感染結石形成に関与しないと判断された。また、*P. mirabilis* および *S. saprophyticus* は、感染結石形成に関連があり、とくに *P. mirabilis* による尿路感染では、感染結石はほぼ必発と考えられ、また *S. saprophyticus* の尿路感染では、条件が整えば感染結石を発症すると思われる。今回の実験は、一度に多量の菌を接種し、急性感染をおこし、1週間という短期間に結石形成の有無を調べるものであった。観察期間が1週間ではやや短すぎる感もあるが、これまでのラットを用いた感染結石形成の実験³⁻⁵⁾では、菌接種から屠殺までの期間は、5日から30日とさまざまであった。5菌種で同量の菌を接種してラットが致命的にならない程度の感染を長期間持続することはなかなか難しく、われわれは2週間観察の実験も試みたが菌種により重篤な感染で死亡する頻度が多くなった。逆に感染が治癒傾向に向かうラットもみられた。2週間では結石は増大するが、菌種別の結石の頻度はほとんど変わらず、われわれは1週間の観察期間で接種菌が感染結石形成に関与するかどうかは判断できると考えた。臨床でわれわれが遭遇する尿路結石は、長い時間をかけて成長したものであり、今回の実験の結果がただちに臨床に直結するとはいいがたい。しかし、今回の結果は、臨床とよく合致し、この2菌種は、しばしば臨床で尿路結石患者より分離されており^{6,12,13)}、とくに結石の治療に際し、注意を要する。

結 語

ウィスター系の雄ラットの膀胱に手術的に、亜鉛リングおよび *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* および *S. saprophyticus* を接種し、感染結石形成を調べた。

1. *P. mirabilis* 接種ラットで尿 pH の上昇が著しかった。また、*S. saprophyticus* を接種したラットでも軽度の尿 pH の上昇がみられた。しかし、*E. coli*, *P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* を接種したラットでは尿 pH の変化はみられなかった。

2. *P. mirabilis* および *S. saprophyticus* 接種ラットでは、それぞれ100%, 60%で膀胱結石がみられ、いずれも成分はリン酸マグネシウムアンモニウムであった。*P. aeruginosa* および *K. pneumoniae* を接種したラットでは、数匹にごくわずかな結石がみられたのみ

である。また、*E. coli* では、結石はみられなかった。

3. *P. mirabilis* および *S. saprophyticus* が感染結石形成に重要である。この実験結果は、一般臨床の結石に伴う感染症の分離菌の結果にもよく合致する。

文 献

- 1) Griffith DP: Struvite stones. *Kidney Int* **13**: 372-382, 1978
- 2) Resnick MI: Evaluation and management of infection stones. *Urol Clin North Am* **8**: 265-276, 1981
- 3) Takeuchi H, Kobashi K and Yoshida O: Prevention of infected urinary stones in rats by urease inhibitor a new hydroxamic acid derivative. *Invest Urol* **18**: 102-105, 1980
- 4) Satoh M, Munakata K, Kitoh K, et al.: A newly designed model for infection-induced bladder stone formation in the rat. *J Urol* **132**: 1247-1249, 1984
- 5) Nickel JC, Olson M, Mclean RJC, et al.: An ecological study of infected urinary stone genesis. *Brit J Urol* **59**: 21-30, 1987
- 6) 竹内秀雄, 岡田裕作, 吉田 修, ほか: 結石にともなう尿路感染症 1 尿路感染の意義について. *泌尿紀要* **35**: 749-754, 1989
- 7) 新井 豊, 竹内秀雄, 友吉唯夫, ほか: 尿中分離細菌のウレアーゼ活性. *泌尿紀要* **35**: 277-281, 1989
- 8) Vermeulen CW and Goetz R: Experimental urolithiasis VIII: furadantin in treatment of experimental *Proteus* infection with stone formation. *J Urol* **72**: 99-104, 1954
- 9) 平石攻治, 中村章一郎, 山本修三, ほか: 尿素分解細菌によるサンゴ状結石の形成. *臨泌* **39**: 53-58, 1985
- 10) 竹内秀雄, 岡田裕作, 吉田 修, ほか: 結石にともなう尿路感染症 2. 結石内細菌に対する抗菌剤の効果について. *泌尿紀要* **35**: 755-761, 1989
- 11) 吉田 修, 桐山喬夫, 岡田謙一郎, ほか: 感染をともなう尿路結石の細菌学的研究. *泌尿紀要* **30**: 191-198, 1984
- 12) Hellstrom J: The significance of *Staphylococci* in the development and treatment of renal and ureteral stones. *Br J Urol* **10**: 348-372, 1938
- 13) Rose GA and Rosenbaum TP: Recurrent infection stones with apparently negative cultures. The case for blind antibacterial treatment. *Br J Urol* **69**: 234-239, 1992

(Received on October 7, 1996)

(Accepted on December 12, 1996)

(迅速掲載)